Aus der Universitäts-Frauenklinik der Charité zu Berlin
(Direktor: Professor Dr. G. A. Wagner)
Dekan: Prof. Dr. Georg Magnus

Grundlagen der nephelometrischen Cholesterin-Bestimmung

von Heinz Wolff aus Berlin

Tag der Promotion: 29. Mai 1936

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde an der Friedrich-Wilhelm Universität zu Berlin.

206

Gedruckt mit Genehmigung
der
Medizinischen Fakultät der Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. Georg Magnus
Referent: Professor Dr. G. A. Wagner

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

A. Versuche mit reinen Cholesterinlösungen.

Auf die Grundlagen der Nephelometrie — der Trübungsmessung nach dem der Kolorimetrie analogen Prinzip — und auf die Einzelheiten einer exakten nephelometrischen Messung kann im Rahmen dieser Arbeit nicht eingegangen werden. Sie dürfen wohl als allgemein bekannt vorausgesetzt werden.

Wichtig für die genauen Bestimmungen ist ein zuverlässiges Nephelometer. Wir benutzten das von *Kleinmann* angegebene Nephelometer (*Schmidt & Hänsch*, Berlin), das sich für andere nephelometrische Untersuchungen seit Jahren bewährt hat.

Die Größenordnung der bei unseren Versuchen verwendeten Cholesterinmengen wurde von Anfang an so gewählt, daß sie den in der Norm in 1 ccm Blutserum vorkommenden Mengen entsprach. 1 ccm Serum enthält normalerweise 1,3 bis 1,8 mg Gesamtcholesterin, davon sind etwa 0,5 bis 0,7 mg freies Cholesterin. Da die Methode eine getrennte Bestimmung des freien und des veresterten Cholesterins ermöglichen sollte, mußte eine exakte Bestimmung von Cholesterinmengen in einer gewissen Breite um 0,5 mg möglich sein. Unsere Methode erlaubt, Cholesterinmengen zwischen 0,2 bis 0,8 mg zu bestimmen.

Die nephelometrische Cholesterinbestimmung wurde zuerst an reinen Lösungen ausgearbeitet und auf ihre Zuverlässigkeit geprüft. Wir sind bei der Ausarbeitung von den bei der makro-gravimetrischen Methode gewonnenen Erfahrungen ausgegangen. Als Lösungsmittel verwendeten wir den 96%igen Äthylalkohol, in dem sich Cholesterin und Digitonin gut lösen, während das Cholesterin-Digitonid praktisch unlöslich ist. Bei der gravimetrischen Bestimmung fällt das Digitonid kristallinisch aus. Zu nephelometrischen Bestimmungen mußten wir Bedingungen finden, bei denen die Ausfällung in Form einer gleichmäßigen Trübung geschah. Als bestes Verfahren hat sich der Wasserzusatz erwiesen. Gibt man zu der alkoholischen Lösung von Cholesterin und Digitonin Wasser, so entsteht bei bestimmten Konzentrationsverhältnissen eine gleichmäßige Trübung des Cholesterin-Digitonids.

Die Luftbläschenbildung, die beim Mischen von Alkohol und Wasser auftritt und eine nephelometrische Ablesung unmöglich macht, läßt sich vermeiden, wenn man die weiter unten angegebenen Vorsichtsmaßregeln gebraucht.

Versuche, das Wasser durch andere Trübungsmittel zu ersetzen, ergaben keine Vorteile. Versuche mit Äther, Methylalkohol, Benzol, Aceton und Pyridin ergaben entweder keine Ausfällung des Cholesterin-Digitonids, oder das Digitonin fiel allein schon aus. Versuche, den Alkohol durch ein anderes Lösungsmittel zu ersetzen, hatten keinen Erfolg, da diese Lösungsmittel entweder eine zu geringe Löslichkeit für Cholesterin und Digitonin besaßen, oder eine zu große Löslichkeit für das Cholesterin-Digitonid aufwiesen, so daß eine quantitative Ausfällung des Digitonids nicht möglich war.

Als bestes Verhältnis von Alkohol und Wasser hat sich zur Erzeugung einer stets gleichmäßigen Trübung 10 ccm Alkohol + 5 ccm Wasser erwiesen. An Kontrolluntersuchungen war zuerst zu beweisen, daß Cholesterin und Digitonin allein in der zu analysierenden Größenordnung keine Trübung ergaben.

Während die von uns bestimmten Cholesterinmengen sich zwischen 0,2 und 1 mg bewegen, zeigen erst 3,5 mg Cholesterin in 10 ccm Alkohol

gelöst, bei Zusatz von 5 ccm Wasser eine Trübung, die auf das Ausfallen von Cholesterin zurückzuführen ist. Digitonin ergibt noch keine Ausfällung, wenn man 200 mg in 10 ccm Alkohol löst und dann 5 ccm Wasser zusetzt, während wir für unsere Versuche nur eine Digitoninmenge von 5 mg benötigen.

Das Cholesterin-Digitonid hingegen zeigt nur eine sehr geringe Löslichkeit in Alkohol. Um 1 mg Cholesterin-Digitonid zu lösen, benötigt man etwa 25 ccm 98%igen Alkohol. Nach dem Zusatz des Trübungsmittels, also des Wassers, haben wir einen ungefähr 66%igen Alkohol, in dem das Cholesterin-Digitonin praktisch unlöslich ist. Bei unseren Vorversuchen gelang es uns nicht, 1 mg Cholesterin-Digitonid in 1000 ccm 66%igem Alkohol zu lösen.

Während die zur Bildung des Cholesterin-Digitonids theoretisch nötige Menge Digitonin bei 0,2 mg Cholesterin rund 0,8 mg beträgt, und 1,0 mg Cholesterin rund 4,0 mg Digitonin verbraucht, ist es jedoch ebenso wie bei der makro-gravimetrischen Methode erforderlich, das zur Bildung des Digitonids verwendete Digitonin im Überschuß zuzusetzen. Um die nötige Digitoninmenge festzustellen, stellten wir eine Reihe von Versuche an, bei denen wir einer bestimmten Cholesterinmenge verschiedene Mengen einer 1%igen Digitoninlösung zusetzten und die so erzeugten Trübungen mit einer Lösung verglichen, die 0,5 ccm einer 1%igen Digitoninlösung enthält. Zur Trübungserzeugung verwendeten wir gleichbleibend 5 ccm Wasser.

Diese Versuche sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

Nr.	Cholesterin mg	Digitonin	Ablesung (Mittelwert)	Gefundener Wert mg
1	0,3	0,3 ccm 1%ige Digitoninlösung	30 : 30,4	0,29
2	0,3	0,4 „ 1 „ „	30 : 29,9	0,30
3	0,3	0,5 „ 1 „ „	30 : 30,0	0,30
4	0,3	0,6 „ 1 „ „	30 : 30,5	0,29
5	0,3	0,7 „ 1 „ „	30 : 32,8	0,27
6	0,3	1,0 „ 1 „ „	30 : 34,3	0,26
7	0,6	0,3 „ 1 „ „	30 : 31,1	0,58
8	0,6	0,4 „ 1 „ „	30 : 30,0	0,60
9	0,6	0,5 „ 1 „ „	30 : 30,0	0,60
10	0,6	0,6 „ 1 „ „	30 : 30,2	0,60
11	0,6	0,7 „ 1 „ „	30 : 31,6	0,57
12	0,6	1,0 „ 1 „ „	30 : 31,9	0,56
13	0,6	2,0 „ 1 „ „	30 : 32,9	0,55
14	0,8	0,3 „ 1 „ „	30 : 33,2	0,72
15	0,8	0,4 „ 1 „ „	30 : 30,8	0,78
16	0,8	0,5 „ 1 „ „	30 : 30,0	0,80
17	0,8	0,6 „ 1 „ „	30 : 30,2	0,79
18	0,8	0,7 „ 1 „ „	30 : 31,8	0,75
19	0,8	1,0 „ 1 „ „	30 : 34,1	0,70

Aus der Tabelle geht hervor, daß bei den von uns angewandten Cholesterinkonzentrationen zwischen 0,2 bis 0,8 mg 0,5 ccm einer 1%igen Digitoninlösung stets ausreichend für eine quantitative Trübung sind.

Es ist bei allen Versuchen unbedingt nötig, daß der Digitoninzusatz vor dem Wasserzusatz erfolgt. Eine Anzahl von Ansätzen, bei denen wir den Versuch machten, das zur Fällung notwendige Wasser vorher dem Alkohol zuzusetzen, ergaben keine brauchbaren Resultate.

In einer weiteren Versuchsreihe untersuchten wir, welcher Wasserzusatz das beste Resultat ergab: Wir lösten 0,6 mg Cholesterin in wechselnden Mengen Alkohol, denen jeweils nach Zusatz von 0,5 ccm einer 1%igen Digitoninlösung wechselnde Mengen von Wasser zugesetzt wurden, und zwar so, daß immer eine Gesamtflüssigkeitsmenge von 15 ccm resultierte. Bei diesen verschiedenen Alkohol- und Wasserkonzentrationen gab weder das Cholesterin noch das Digitonin für sich allein eine Trübung. Diese Versuche sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Ansatz: 0,6 mg Cholesterin und 0,5 ccm 1%ige Digitoninlösung.

Alkoholmenge ccm	H_2O-Menge ccm	Ausflockung nach Min.	Bemerkungen
14	1	33	Trübung schwach
13	2	14	„ „
12	3	15	
11	4	15	
10	5	12	Optimale Trübung nach 5 Min.
9	6	12	
8	7	10	
7	8	12	
6	9	9	
5	10	7	
4	11	10	

Aus der obigen Tabelle geht hervor, daß die günstigste Alkoholmenge zwischen 8 und 12 ccm und die entsprechende Wassermenge zwischen 7 und 3 ccm liegt. Wir wählten für unsere Versuche eine Alkoholmenge von 10 ccm und einen Wasserzusatz von 5 ccm.

Wichtig für die Bestimmungen ist der Zeitfaktor: Der Niederschlag braucht bis zur Erreichung der optimalen Trübung, bei der die Ablesung erfolgen muß, eine gewisse Zeit. Nach einer weiteren Zeitspanne tritt dann die Ausflockung auf, bei der eine Ablesung infolge der veränderten Teilchengröße keine brauchbaren Resultate mehr ergibt. Es mußte untersucht werden, in welcher Zeit die optimale Trübung bei den verschiedenen Konzentrationen des Cholesterins eintritt.

Der Eintritt der optimalen Trübung wurde mit dem von *Kleinmann* angegebenen Trübungsstandard gemessen. Dieser besteht aus einem Mattglasröhrchen, das die Stelle einer Vergleichslösung im Nephelometer einnimmt. Die folgenden Kurven zeigen die Zusammenstellung einer Reihe von Versuchen, bei der sechs Cholesterinlösungen von wechselnder Cholesterinkonzentration mit dem Trübungsstandard verglichen worden sind. Als Abszisse für diese Kurven wurde die Zeit in Minuten nach dem Ansatz der Lösungen angegeben, bei der die Ablesung erfolgte. Als Ordinate wurden die abgelesenen Nephelometerwerte eingetragen. Die Kurven hören an dem Zeitpunkt auf, in welchem die Ausflockung eintritt.

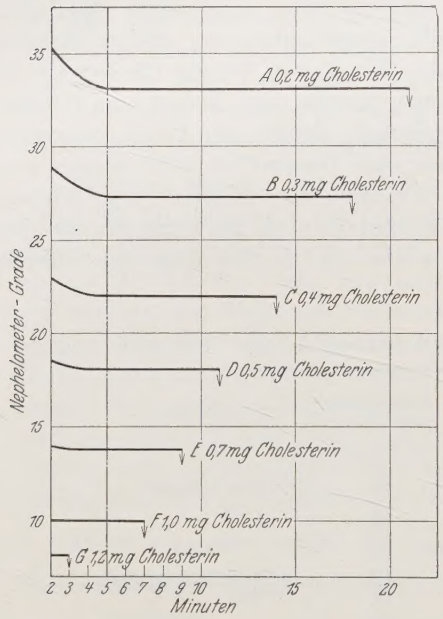

Abb. 1.

Die nebenstehende Kurve zeigt, daß bei geringeren Cholesterinkonzentrationen die optimalen Trübungswerte nach Ablauf von 5 Minuten nach dem Ansatz eintreten und dann längere Zeit hindurch konstant bleiben, bis dann schließlich die Ausflockung eintritt. Bei höheren Cholesterinkonzentrationen tritt das Trübungsoptimum, wie es die Kurven *E* und *F* zeigen, sehr schnell ein, andererseits flocken diese Lösungen — wie es gleichfalls die Kurven *E* und *F* zeigen — schneller aus.

Aus diesen Versuchen kann man zwei Schlüsse ziehen: 1. daß die Cholesteringrenzkonzentration bei der von uns gewählten Alkohol-Wasserkonzentration nach oben 1,2 mg beträgt. Bei höherer Konzentration verhindert die zeitige Ausflockung eine brauchbare Ablesung. Andererseits beträgt die Grenzkonzentration nach unten 0,2 mg, da geringere Konzentrationen keine ablesbaren Trübungen mehr ergeben. Für praktische Versuche zur nephelometrischen Cholesterinbestimmung wählt man am besten Cholesterinkonzentrationen, die nicht zu dicht bei den oben erwähnten Grenzkonzentrationen liegen. Sehr gut bestimmbar sind Konzentrationen zwischen 0,3 und 0,8 mg. Die Ablesung wird am besten nach 5 Minuten vorgenommen, da nach dieser Zeit

zwischen den Cholesterinkonzentrationen von 0,2 bis 0,8 mg die optimale Trübung eingetreten ist.

Den Trübungsstandard benutzten wir weiter dazu, um festzustellen, ob bei Lösungen mit gleichem Cholesteringehalt 1. die Trübung immer gleich ist und 2. das Trübungsoptimum immer zur gleichen Zeit eintritt.

Versuch: Es wurden vier Lösungen, je 0,5 mg Cholesterin enthaltend, mit dem Trübungsstandard verglichen.

Lösung	Ablesung bei gleicher Einstellung des Trübungsstandards	Optimale Trübung nach Min.	Ausflockung nach Min.
1	18,9	3	12
2	18,8	3	12
3	18,9	3	12
4	18,7	3	12

Hieraus geht hervor, daß gleiche Cholesterinkonzentrationen unter gleichen Bedingungen gleich starke Trübungen ergeben, die gleichzeitig ihr Trübungsoptimum und ihren Ausflockungspunkt erreichen.

Beim Vergleich von Cholesterintrübungen untereinander muß man (wie überhaupt bei allen nephelometrischen Vergleichen) beachten, daß die Konzentrationen der zu vergleichenden Lösungen nicht sehr stark differieren. Anderenfalls werden die Resultate ungenau, wie aus einer Anzahl von Versuchsreihen deutlich hervorging. Zur Erläuterung folgendes Beispiel:

Versuch: Mit einer Cholesterinlösung, die 0,5 mg Cholesterin enthält, werden neun Lösungen verschiedener Konzentration, von 0,3 bis 0,6 mg Cholesterin, verglichen. Die gefundenen Werte hatten folgendes Ergebnis und wiesen folgende Fehler (in Prozenten) auf:

Cholesterin-Konzentration	Gefundenes Cholesterin mg	Fehler %
0,3 mg Cholesterin	0,270	— 10
0,35 „ „	0,325	— 7
0,4 „ „	0,381	— 5
0,425 „ „	0,415	— 2
0,45 „ „	0,44	— 2
0,5 „ „	0,501	± 0
0,55 „ „	0,56	+ 2
0,575 „ „	0,60	+ 4
0,6 „ „	0,640	+ 7

Für exakte Untersuchungen ist es also notwendig, daß der Cholesteringehalt der Vergleichslösung von dem der zu untersuchenden Lösung um nicht mehr als 0,075 mg differiert.

Versuche zur Stabilisierung der Trübung.

Um eine längere Stabilität der Cholesterin-Digitonidtrübungen zu erreichen und so eine Ablesung während eines größeren Zeitraumes zu ermöglichen, führten wir eine größere Anzahl von Versuchen mit Schutzkolloiden aus. 0,6 mg Cholesterin wurde jeweils mit den unten erwähnten Kolloidlösungen versetzt und mit einer Cholesterinlösung gleicher Konzentration ohne Schutzkolloid verglichen. Versuche, mit Kollodium, Gelatine, Stärke, Mastix und Gummiarabicum eine Stabilität der Cholesterin-Digitonidtrübungen zu erreichen, führten jedoch nicht zum Ziele. Versuche, durch Veränderung des Aziditätsgrades eine Stabilisierung der Cholesterin-Digitonidtrübung zu erreichen, durch Zusatz von Alkalien (Ammoniak, Natronlauge) oder von Säuren (Schwefelsäure) in wechselnder Konzentration, verliefen ebenfalls negativ.

B. Cholesterinbestimmung bei Anwesenheit von Begleitstoffen.

Es folgt jetzt eine Reihe von Versuchen, bei denen den Cholesterinlösungen Stoffe zugesetzt wurden, die neben dem Cholesterin aus dem Blutserum extrahiert werden und von denen festgestellt werden mußte, ob sie bei der nephelometrischen Cholesterinbestimmung irgendwie hindernd wirken. Als Beispiel für die Begleitstoffe, die hauptsächlich zu den Lipoiden gehören, wählten wir das Triolein, den Cholesterinester und eine Mischung von Palmitinsäure, Stearinsäure und Ölsäure.

1. Triolein und Cholesterin-Palmitinsäureester.

Zuerst wurde der Einfluß des Trioleins untersucht: Es wurden drei Lösungen hergestellt, die in je 10 ccm Alkohol 0,2, 1 und 2,5 mg Triolein enthielten. Dann wurde diesen Lösungen je 5 ccm Wasser zugesetzt. Diese Versuche ergaben, daß Triolein in Konzentrationen, die größer als 0,5 mg sind, ohne Anwesenheit von Cholesterin und Digitonin in der von uns angewandten Alkohol-Wasserkonzentration eine Trübung ergibt. Geringere Mengen als 0,5 mg zeigten bei nephelometrischen Vergleichen zwischen reinen Cholesterinlösungen und Cholesterinlösungen mit Trioleinzusatz, daß durch ihre Gegenwart die Trübungswerte der Cholesterin-Digitonidlösungen derart verändert werden, daß ein Vergleich mit einer reinen Cholesterin-Digitonidlösung gleicher Konzentration nicht möglich ist. Die Störungen, die bei der nephelometrischen Cholesterinbestimmung durch die Anwesenheit des Cholesterinesters entstehen, sind genau die gleichen, wie die durch Triolein hervorgerufenen.

Es ist also zur exakten Cholesterinbestimmung unumgänglich nötig, sowohl das Triolein als auch den Cholesterinester zu entfernen.

2. Fettsäuren.

Entsprechend den Versuchen mit Triolein wurden auch mit den Fettsäuren zunächst Leerversuche ohne Cholesterin unternommen, die ergaben, daß Fettsäuren allein (wieder in 10 ccm Alkohol gelöst, dann Zusatz von 5 ccm Wasser) keine Trübung ergaben. Die Versuche wurden mit Stearin, Palmitin- und Oleinsäure in wechselnder Konzentration bis zu 5 mg durchgeführt. Nachdem also festgestellt war, daß die Fettsäuren in den oben erwähnten Konzentrationen keine Trübung verursachen, wurde eine Reihe von Fettsäure-Cholesterinlösungen mit reinen Cholesterinlösungen von gleichem Cholesteringehalt verglichen. Aus diesen Versuchen ergab sich, daß die Fettsäuren schon in geringen Konzentrationen eine beschleunigte Ausflockung bewirken, ehe die optimale Trübung der Vergleichslösungen ohne Fettsäuren eingetreten ist und so eine nephelometrische Ablesung unmöglich wird.

Wir untersuchten nun, ob sich die ausflockende Wirkung der Fettsäuren auf die Cholesterin-Digitonidtrübung nicht durch Neutralisation der Säuren beseitigen ließe. Diesbezügliche Neutralisationsversuche mit Ammoniak und Natronlauge ergaben eine längere Stabilität der Trübungen, aber die Ablesungswerte zeigten so große Differenzen (bis zu 10%) mit den Vergleichslösungen, daß sich auch dieses Verfahren für eine genaue Cholesterinbestimmung als unbrauchbar erwies. Aus diesem Grunde mußte eine Entfernung der Fettsäuren — ebenso wie eine Entfernung des Trioleins und des Cholesterinesters — versucht werden.

Versuche zur Entfernung der Fettsäuren.

Da die Löslichkeit des Cholesterins und der Fettsäuren in organischen Lösungsmitteln weitgehend übereinstimmt, ist eine Trennung durch einfache Anwendung eines Lösungsmittels nicht möglich. Eine Trennung wird also nur möglich sein, wenn eine Komponente des Gemisches in eine unlösliche Form übergeführt wird. Wir versuchten erstens, die Fettsäure in Form ihrer Bariumsalze abzutrennen und zweitens, das Cholesterin in das unlösliche Cholesterin-Digitonid überzuführen. Das erste Verfahren der Entfernung der Fettsäuren durch die Bariumsalze gelang uns auch bei Anwendung der mannigfachsten Versuchsbedingungen nicht. Wir verzichten daher, um Raum zu sparen, auf jede Wiedergabe unserer Versuchsanordnungen.

Zur Durchführung des zweiten Verfahrens führten wir einige Vorversuche über die Löslichkeitsverhältnisse des Cholesterin-Digitonids durch: Cholesterin—Digitonid ist unlöslich in Äther, Aceton; sehr schwer löslich in Äthylalkohol; leichter löslich in Methylalkohol. In

100 ccm Methylalkohol lösen sich bei 20° 250 mg Cholesterin-Digitonid; in heißem Methylalkohol ist das Cholesterin-Digitonid sehr leicht löslich. Zur Lösung des Cholesterin-Digitonids konnte daher nur Methylalkohol benutzt werden. Es mußte nun zuerst der Einfluß des Methylalkohols auf die Trübung des Cholesterin-Digitonids untersucht werden: Es gelang durch einfaches Ersetzen des Äthylalkohols durch Methylalkohol nicht, eine stabile Trübung zu erzeugen. Das Cholesterin-Digitonid flockt schon in geringen Konzentrationen sofort aus. Eine genau so stabile Trübung wie mit reinem Alkohol erreichten wir dagegen durch Anwendung eines Gemisches von 10 ccm Äthylalkohol und 5 ccm Methylalkohol.

Es war weiter festzustellen, ob eine Trocknung des Cholesterin-Digitonids und eine nachherige Lösung in Methylalkohol die Trübung in irgendeiner Weise beeinflußt. Es wurde folgender Versuch angestellt:

Versuch: 0,6 mg Cholesterin wurde in 10 ccm Äthylalkohol gelöst, 0,5 ccm einer 1%igen Digitoninlösung hinzugefügt, zur Trockne gedampft, in 5 ccm Methylalkohol gelöst und nach Zusatz von 10 ccm Äthylalkohol 5 ccm Wasser hinzugefügt. Auf diese Weise wurden vier gleiche Lösungen hergestellt. Zum Vergleich dienten vier Lösungen von gleichem Cholesteringehalt (0,6 mg), bei denen das Cholesterin in 5 ccm Methylalkohol + 9,5 ccm Äthylalkohol gelöst wurde und nach Zusatz von 0.5 ccm einer 1%igen alkoholischen Digitoninlösung die Trübung mit 5 ccm Wasser erzeugt wurde.

Der nephelometrische Vergleich zwischen diesen Lösungen ergab, daß eine Eintrocknung des Cholesterin-Digitonids mit nachfolgender Lösung in Methylalkohol keinen Einfluß auf die Trübungswerte hat.

Durch diese Versuche waren die Grundlagen gesichert, auf denen ein Verfahren zur Trennung der Fettsäuren von dem Cholesterin-Digitonid ausgearbeitet werden konnte.

Es war naheliegend, die mit Digitonin versetzte Lösung zur Trockne zu verdampfen und aus dem Rückstand die Fettsäuren mit Äther zu extrahieren. Zu den Kontrollversuchen stellten wir uns eine Lösung her von Cholesterin mit einer Fettsäuremischung, wie sie ähnlich im Serum vorhanden ist. 0,6 mg Cholesterin + 3 mg Oleinsäure + 2 mg Palmitinsäure wurden in 10 ccm Alkohol gelöst, mit 0,5 ccm einer 1%igen alkoholischen Digitoninlösung versetzt und zur Trockne verdampft und der Rückstand mit Äther extrahiert. Es zeigte sich jedoch, daß die Ätherlösung einen Teil des Cholesterins in Lösung enthielt, wie es durch die positive *Liebermann-Burchhard*sche Reaktion erwiesen wurde. Ebenso fielen Versuche mit Aceton, Petroläther und Benzol aus.

Aus diesen Versuchen mußten wir schließen, daß nach der Eintrocknung keine vollständige Präzipitierung des Cholesterin-Digitonids

eintrat. Auch bei der Ausfällung des Digitonids in Aceton zeigte sich bei vollständiger Eintrocknung mit nachfolgender Extraktion, daß ein Teil des Cholesterins in das Extraktionsmittel überging. Eine quantitative Trennung des Cholesterins von der Fettsäure war nach diesen Versuchen mit einer einfachen Eintrocknung nicht erreichbar. Nur wenn man die Präzipitierung und die Eintrocknung des Digitonids über Stunden vor sich gehen läßt, ist das gesamte Cholesterin in das unlösliche Cholesterin-Digitonid übergeführt.

Da uns dieses Verfahren für unsere Methode zu zeitraubend war, überdies zu unsicher erschien, benutzten wir das Präzipitierungsverfahren, wies es *Szent-Györgyi* für seine gravimetrische Mikrocholesterinbestimmung angegeben hat. Die Ausfällung des Cholesterin-Digitonids wird in Acetonlösung vorgenommen. Man setzt 0,5 ccm Wasser hinzu und verdampft dann langsam das Aceton. Das Cholesterin-Digitonid bleibt dann als halbflüssiger Brei zurück.

Erst nach vielen Vorversuchen, die einzeln aufzuführen infolge Raummangels unmöglich ist, gelang es uns, das geeignete Extraktionsmittel zur Trennung der Fettsäuren vom Cholesterin-Digitonid zu finden. Eine quantitative Trennung gelingt mit einer Mischung von Aceton und Äther im Verhältnis 4 : 10.

Bestimmung des freien Cholesterins bei Gegenwart von Fettsäuren.

Eine unbekannte Menge Cholesterin zwischen 0,2 bis 0,8 mg + 3 mg Oleinsäure + 2 mg Palmitinsäure in 2,5 ccm Aceton werden in einem *Phillips*-Becher von 50 ccm Inhalt mit 0,5 ccm einer 1%igen alkoholischen Digitoninlösung und 0,5 ccm Wasser versetzt. Man verdampft dann langsam das Aceton, bis der Acetongeruch vollständig verschwunden ist. Es ist wichtig, dieses Abdampfen langsam vor sich gehen zu lassen, damit die Präzipitierung des Cholesterin-Digitonids vollständig wird. Dauer: Mindestens $^1/_2$ Stunde. Es ist unbedingt darauf zu achten, daß der Rückstand nicht trocken wird. Man versetzt den Rückstand mit etwa 20 ccm einer Mischung von Äther-Aceton (10 : 4) und läßt $^1/_2$ Stunde stehen. Nach dieser Zeit wird die Lösung durch ein hartes Filter filtriert, und zwar so, daß der Cholesterin-Digitonidniederschlag nach Möglichkeit im Kölbchen zurückbleibt. Das Dekantieren wird noch zweimal wiederholt, doch ist ein Stehenlassen nach dem nochmaligen Zusatz von Aceton-Äther nicht mehr notwendig. Das zurückbleibende Cholesterin-Digitonid wird in heißem Methylalkohol gelöst, ebenso wird das Filter mit heißem Methylalkohol ausgewaschen, um etwa auf das Filter gelangtes Cholesterin-Digitonid zu lösen. Die methylalkoholische Lösung wird zur Trockne verdampft.

Der Rückstand wird wieder in genau 5 ccm Methylalkohol gelöst. Zu der Lösung gibt man 10 ccm Äthylalkohol hinzu. Gleichzeitig bereitet man sich drei Vergleichslösungen mit Cholesterin, die in 9,5 ccm 96%igem Alkohol je 0,35, 0,5 und 0,65 mg Cholesterin enthalten, und gibt zu diesen Lösungen gleichfalls je 0,5 ccm einer 1%igen Digitoninlösung und 5 ccm Methylalkohol. Die Analysenlösung und die Vergleichslösungen werden gleichzeitig mit je 5 ccm Wasser, das man am besten aus einer Bürette zugibt, versetzt. Man vergleicht mit dem bloßen Auge, in welcher Vergleichslösung die Trübung der Analysenlösung am ähnlichsten ist. Diese Vergleichslösung und die Analysenlösung werden 5 Minuten nach dem Ansatz im Nephelometer gegeneinander genau abgelesen. Aus dem abgelesenen Wert kann unmittelbar der Cholesteringehalt der Analysenlösung errechnet werden. Ist s der Trübungswert der Vergleichslösung, s_x der Trübungswert der Analysenlösung, a der Cholesteringehalt der Vergleichslösung und x derjenige der Analysenlösung, so ist

$$\frac{s}{s_x} = \frac{x}{a}; \quad \text{z. B. } s = 30, \quad s_x = 33{,}3, \quad a = 0{,}5;$$

$$\frac{30}{33{,}3} = \frac{x}{0{,}5}; \quad x = \frac{30 \,.\, 0{,}5}{33{,}3} = 0{,}45 \text{ mg Cholesterin.}$$

Anschließend geben wir eine Aufstellung von einer Anzahl von Versuchen, bei denen wir das Cholesterin nach der oben angegebenen Methode bestimmt haben:

Nr.	Gefundene Cholesterinmenge mg	Berechnete Cholesterinmenge mg
1	0,60	0,60
2	0,495	0,50
3	0,596	0,60
4	0,61	0,60
5	0,32	0,33
6	0,575	0,57
7	0,42	0,45

Aus dieser Tabelle geht hervor, daß es mit diesem Verfahren gelingt, auch bei Gegenwart von Fettsäuren, das Cholesterin exakt nephelometrisch zu bestimmen.

Versuche zur Verseifung des Cholesterinesters.

Für die Brauchbarkeit einer Cholesterinbestimmungsmethode ist entscheidend, daß eine gesonderte Bestimmung des veresterten Cholesterins möglich ist. Da es keine spezifische Reaktion für die Cholesterinester gibt, müssen sie verseift und das bei der Verseifung frei gewordene Cholesterin bestimmt werden. Die Schwierigkeiten der Verseifung

liegen darin, daß die Cholesterinester schwer zu verseifen sind; bei der Anwendung stärkerer Verseifungsprozeduren besteht die Gefahr der Zerstörung des Cholesterins.

Wir sind in unserer Mitteilung über die gravimetrische Cholesterinbestimmung im Serum[1] ausführlich auf diese Schwierigkeiten eingegangen, so daß wir hier auf diese Mitteilung verweisen können.

3. Versuche mit Natriumäthylat.

Von den Erfahrungen ausgehend, die wir bei der Ausarbeitung der gravimetrischen Methode gemacht hatten, versuchten wir, das Natriumäthylat auch bei der nephelometrischen Methode zur Verseifung des Cholesterinesters zur Anwendung zu bringen. Eine einfache Übertragung des von uns bei der gravimetrischen Methode beschriebenen Verfahrens schien uns bei der nephelometrischen Methode nicht durchführbar, da die Extraktion der verseiften Cholesterinester die nephelometrische Mikromethode sehr komplizieren würde. In Vorversuchen mit reinem Cholesterin suchten wir nach einem geeigneten Extraktionsverfahren nach der Verseifung. Um die Art unserer Versuchsanordnungen zu charakterisieren, geben wir von vielen Versuchsanordnungen nur ein Versuchsprotokoll.

5 mg Triolein + 0,8 mg Cholesterin wurden in 10 ccm Alkohol gelöst und mit 2 ccm Na-Äthylat (3 %ig) versetzt. Diese Lösung wurde zur Trockne gedampft, der Rückstand mit Petroläther fünfmal extrahiert und der Petrolätherextrakt filtriert. Dann wurde der Petroläther abgedampft und der dabei sich ergebende Rückstand in 10 ccm Alkohol gelöst, 0,5 ccm Digitoninlösung und 5 ccm Wasser hinzugesetzt und schließlich im Nephelometer mit einer unbearbeiteten Cholesterinlösung von 0,8 mg verglichen. Bei diesem Verfahren traten jedoch große Differenzen auf (gefundener Cholesterinwert 0,68 statt 0,8 mg).

Bei einer Reihe von weiteren Versuchen, die mit den verschiedensten Cholesterinkonzentrationen durchgeführt wurden, versuchten wir durch Änderung des Extraktionsmittels (Äthyläther statt Petroläther) und durch häufigere Extraktion (bis zu zehnmal) vergeblich, eine quantitative Extraktion des Cholesterins zu erreichen. Es gelingt nicht, aus dem eingetrockneten Rückstand das Cholesterin quantitativ herauszulösen. Auch eine Verringerung der Natrium-Äthylatmenge bis auf 0,2 ccm war erfolglos. Bei noch niedrigerer Konzentration des Na-Äthylats findet keine vollständige Verseifung mehr statt.

Um eine quantitative Bestimmung zu ermöglichen, wurde in mehreren Versuchen unter Änderung aller möglichen Bedingungen die Extraktion nach Neutralisation vorgenommen. Auch diese Veränderungen zeitigten keine besseren Resultate. Es wurde dann auf eine

[1] Diese Zeitschr. **233**, 222, 1931.

Eintrocknung des Niederschlags überhaupt verzichtet: 1 ccm Wasser wurde hinzugefügt und dann eine Extraktion, nach Zusatz von reinem Wasser, nach Neutralisation und nach Ansäuerung versucht. Auch diese Variationen der Extraktion ergaben keine brauchbaren Resultate.

4. Versuche mit Natronlauge.

Bei einer weiteren Reihe von Verseifungsversuchen wendeten wir Natronlauge an. Auch hier wurden die Bedingungen und Extraktionen analog verändert, wie oben bei den Versuchen mit Na-Äthylat beschrieben.

Als positives Ergebnis aus diesen zahlreichen Versuchen mit NaOH können wir die Beobachtungen *Okeys* bestätigen, daß Cholesterin bei Gegenwart von Alkali und Luftsauerstoff beim trockenen Erhitzen zerstört wird. Um diese Faktoren auszuschalten, hat *Okey* vorgeschlagen, die Eintrocknung nach der Verseifung in einer Kohlensäureatmosphäre vorzunehmen. Da uns dieses Verfahren zu umständlich erschien, arbeiteten wir ein anderes Verfahren aus, um diese Schwierigkeiten zu umgehen. Die von uns ausgearbeitete Verseifungsvorschrift ist folgende:

Bestimmung des Estercholesterins.

1 mg Cholesterin-Stearinsäureester in 10 ccm Äthylalkohol wird mit 0,1 ccm konzentrierter Natronlauge versetzt und auf dem Wasserbad erhitzt. Ist der Alkohol bis auf 1 ccm eingedampft, gibt man 0,5 ccm molare Phosphorsäure und 15 ccm Petroläther hinzu. Unter kräftigem Umschütteln und Erhitzen zum Sieden dekantiert man den Petroläther durch ein kleines Filter von der wässerigen Lösung ab. Das Dekantieren wird vier- bis fünfmal wiederholt. Der Petroläther wird verdampft und der Rückstand in 2,5 ccm Aceton gelöst. Diese Lösung wird dann weiter behandelt, wie bei der Bestimmung des freien Cholesterins bei Gegenwart von Fettsäuren S. 239 beschrieben. Der erhaltene Wert gibt das veresterte Cholesterin an.

Diesem Verseifungsverfahren wurden Cholesterin- und Cholesterinesterlösungen unterworfen. Einige Ergebnisse sind hier in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Nr.	Gefundene Cholesterinmenge mg	Berechnete Cholesterinmenge mg
1	0,60	0,60
2	0,58	0,60
3	0,60	0,60
4	0,49	0,50
5	0,47	0,50
6	0,60	0,60
7	0,597	0,60

Nr.	Gefundene Ester-Cholesterinmenge mg	Gravimetrisch gefundene Ester-Cholesterinmenge mg
8	0,52	0,51
9	0,53	0,51
10	0,51	0,51

Zusammenfassung.

Es wird gezeigt, daß durch unser nephelometrisches Verfahren eine exakte Bestimmung des freien und des gebundenen Cholesterins möglich ist.

Literatur.

1) *Szent-Györgyi*, diese Zeitschr. **136**, 107, 1923. — 2) *Mancke*, ebendaselbst **231**, 103, 1931. — 3) *Mühlbock* u. *Kaufmann*, ebendaselbst **233**, 222, 1931. — 4) *R. Okey*, J. of biol. Chem. 88, 367, 1930. — 5) *Windaus*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **65**, 110, 1910.

Lebenslauf.

Ich, Heinz Wolff, wurde am 29. November 1906 zu Berlin geboren. Nach Besuch des Werner Siemens Realgymnasiums zu Berlin-Schöneberg und des Wilhelms-Gymnasiums zu Eberswalde bestand ich Michaelis 1926 die Reifeprüfung am Schiller-Realgymnasium in Berlin-Charlottenburg. Vom Wintersemester 1926/27 an studierte ich in Berlin und Würzburg Medizin und bestand im März 1929 die ärztliche Vorprüfung in Berlin. Nach klinischem Studium in Freiburg und Berlin meldete ich mich im November 1931 zur ärztlichen Staatsprüfung.

Die hier vorgelegte Arbeit vollendete ich an der Universitäts-Frauenklinik zu Berlin und spreche an dieser Stelle Herrn Professor Dr. G. A. Wagner für die Überlassung des Themas und für die Erlaubnis zur Durchführung der Arbeit im Laboratorium der Klinik meinen aufrichtigen Dank aus.